

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS-JÜRGEN SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AAV PLASMID DNA SIMPLIFIES LIVER-DIRECTED *IN VIVO* GENE
THERAPY: COMPARISON OF EXPRESSION LEVELS AFTER PLASMID
DNA-, ADENO-ASSOCIATED VIRUS- AND ADENOVIRUS-MEDIATED
LIVER TRANSFECTION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Axel Doenecke

2013

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS-JÜRGEN SCHLITT
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AAV PLASMID DNA SIMPLIFIES LIVER-DIRECTED *IN VIVO* GENE
THERAPY: COMPARISON OF EXPRESSION LEVELS AFTER PLASMID
DNA-, ADENO-ASSOCIATED VIRUS- AND ADENOVIRUS-MEDIATED
LIVER TRANSFECTION

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Axel Doenecke

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Edward K. Geissler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hehlhans

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2013

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
ORIGINALARBEIT	17
LEBENS LAUF	26
DANKSAGUNG	28
ERKLÄRUNGEN	29

Zusammenfassung

Einleitung (z.T. aus [1])

Seit den ersten gentherapeutischen Experimenten an Mäusen in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts stehen den ausgesprochen hohen Erwartungen an die Gentherapie große ethische, konzeptionelle, und vor allem technische Probleme gegenüber, die bis heute größtenteils ungelöst sind [2, 3]. Insbesondere die Problematik des sicheren und effizienten Gentransfers in die jeweilige Zielzelle war in der Vergangenheit die Ursache für die größtenteils unerfüllten Erwartungen, insbesondere im Rahmen der *in vivo* Gentherapie vaskularisierter Organe.

Die zu Beginn der Entwicklung verwendeten retroviralen Vektorsysteme ermöglichen zwar einen effizienten Gentransfer auch *in vivo* und wurden in Untersuchungen zur Korrektur genetischer Defekte bzw. in der Therapie hepatozellulärer Karzinome verwendet [4, 5]. Vorteilhaft ist die stabile Integration in das Genom der Zielzelle, was zu einer lang anhaltenden Expression des Transgens führt, nachteilhaft ist die zufällige Integration in das Genom mit der potentiellen Gefahr der Aktivierung von Onkogenen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass Retroviren nur sich teilende Zellen infizieren. Dieses Problem wird zwar durch die Verwendung von rekombinanten Lentiviren (z.B. auf Basis des HIV-1), die auch ruhende Zellen infizieren, umgangen, die hierdurch entstehenden Fragen der biologischen Sicherheit sind jedoch letztlich ungeklärt.

Adenovirale Systeme ermöglichen ebenfalls einen effizienten Gentransfer sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*. Nach venöser Applikation zeigt sich die stärkste Expression des jeweiligen Transgens in der Leber [6]. Rekombinante Adenoviren werden aufgrund des effizienten Gentransfers in einer Vielzahl von Untersuchungen zur Expression von Transgenen in der Leber verwendet, unter anderem zur Tumorgentherapie [7-9], zur Korrektur genetischer Defekte [10], zur Therapie der Hepatitis [11] oder im Rahmen der Transplantationschirurgie [12, 13]. Der hauptsächliche

Nachteil der adenoviral-vermittelten Transfektion *in vivo* besteht in einer sich schnell entwickelnden zellulären Immunreaktion gegen die transfizierten Zellen, in deren Folge es zu Abnahme der Transgenexpression bis auf Null im Verlauf kommt [14, 15]. Durch die Immunreaktion gegen die Hepatozyten wird zusätzlich eine mehr oder minder starke Hepatitis ausgelöst [16]. Insgesamt werden hierdurch die erwünschten Effekte aufgehoben, zusätzlich kommt es zur Entwicklung von Antikörpern gegen Kapsidproteine des Adenovirus, sodass durch erneute Gabe des Virus keine Transgenexpression mehr erreichbar ist [17]. Die Weiterentwicklung adenoviraler Vektoren, wie zum Beispiel E4-deletierte Adenoviren [18] oder die sogenannten „gutless“ Adenoviren [19], die keine viralen Gene mehr enthalten, führt zwar zu einer Verlängerung der Expressionsdauer *in vivo*, die Problematik der Immunreaktion gegen transfizierte Zellen konnte jedoch nicht vollständig gelöst werden.

Adeno-assoziierte Viren (AAV) besitzen aufgrund der für den Menschen nicht vorhandenen Pathogenität, der Infektiosität für ein breites Spektrum an Zellen sowie der fehlenden Integration des rekombinanten Virus in das Wirtsgenom bei trotzdem bestehender langfristigen Expression mehrere Vorteile im Vergleich zu oben genannten viralen Systemen. Obwohl die Verwendung von rekombinantem AAV in präklinischen Ansätzen sehr vielversprechend erscheint, ist der Weg zur klinischen Anwendung von mehreren Schwierigkeiten begleitet, die noch ungelöst sind. Neben den hohen Produktionskosten [20] sind es vor allem die Entwicklung neutralisierender Antikörper [21], die die Anwendbarkeit von rekombinanten adeno-assoziierten Viren am Menschen stark einschränken.

Eine Lösung dieses Problems stellt gegebenenfalls der Einsatz von Plasmid-DNA dar. Diese ist relativ einfach in großen Mengen herzustellen, und die beschriebenen Nebenwirkungen sind gering. Eine effiziente *in vivo*

Transfektion der Leber durch Plasmid-DNA mittels sogenanntem hydrodynamischen Gentransfer, bei dem die DNA in einem großen Volumen intravenös appliziert wird, konnte in Nagermodellen bereits gezeigt werden [22]. Allerdings kommt es hierbei in den meisten Fällen durch den schrittweisen Verlust der transfizierten Plasmid-DNA zu einer nur temporären Expression des jeweiligen Transgens. In einer vorausgegangenen Arbeit konnten wir jedoch zeigen, dass der *in vivo* Gentransfer von Plasmid-DNA, der kleine Abschnitte des AAV-Genoms, die sogenannten ITRs (inverted terminal repeats) enthält, zu einer langfristigen Genexpression in der Leber führt [23].

Es war jedoch unklar, ob durch die Verwendung dieser AAV-Plasmid-DNA ein ähnlich hohes Expressionsniveau wie durch virale Vektoren erreicht werden kann. **Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.**

Methoden

Als Modellsystem verwendeten wir *Lewis*-Ratten, die sowohl mit entsprechender Plasmid-DNA, als auch mit rekombinanten Viren, die jeweils das Gen für das lösliche MHC-Klasse I-Antigen RT1.Aa enthielten (spezifisch für den MHC-verschiedenen Rattenstamm *DA*), transfiziert wurden. Im Anschluss wurde die Konzentration von RT1.Aa im Serum der betreffenden Tiere im Zeitverlauf gemessen. Insbesondere wurde hierbei untersucht, ob sich die Expressionshöhe bzw. Expressionsdauer nach Gentransfer mittels AAV-Plasmid-DNA von den entsprechenden Ergebnissen nach adeno-assoziiertem Virus-vermitteltem Gentransfer unterscheiden.

Als Kontrolle bzgl. der Expressionshöhe diente der Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren bzw. entsprechender Plasmid-DNA, die keine AAV-ITRs enthielt.

Zum Nachweis einer funktionalen Expression wurden an entsprechend transfizierten Tieren allogene Herztransplantationen durchgeführt. Aufgrund der bekannten (schwach) immunsuppressiven Wirkung von löslichem RT1.Aa wurde die Überlebenszeitverlängerung des Herztransplantats als Nachweis der funktionalen Expression verwendet.

Die Präparation der entsprechenden Plasmide bzw. der rekombinanten Viren erfolgte nach publizierten Standardtechniken, wobei als Promoter zur Expression des RT1.Aa-Gens der murine Albuminpromoter verwendet wurde. Die Transfektion mit rekombinanten Viren (sowohl Adenovirus, als auch AAV) erfolgte durch Injektion der entsprechenden Virusmenge in die Pfortader. Die Transfektion von Plasmid-DNA erfolgte hydrodynamisch über die untere Vena cava. Die notwendigen Mengen an Virus bzw. Plasmid-DNA war bereits in vorausgegangenen Arbeiten bestimmt worden. Diese betrugen 125µg Plasmid-DNA, 1×10^{13} genomische Partikel AAV und 1×10^{11} genomische Partikel Adenovirus. Die Bestimmung des löslichen RT1.Aa-Antigens im Serum transfizierter Tiere erfolgte nach Blutentnahme über die Schwanzvene mittels RT1.Aa-spezifischem ELISA. Allogene Herztransplantationen (DA- auf Lewis-Ratten) erfolgten abdominell nach der Methode von Ono und Linsey.

Ergebnisse

Die Transfektion mittels rekombinantem Adenovirus als auch mittels Plasmid-DNA führte bereits ab Tag 1 zu hohen RT1.Aa-Serumspiegeln, während die Expression nach AAV-vermitteltem Gentransfer erst nach 4-5 Tagen das Maximum erreichte. Im Fall von AAV- und AAV-Plasmid-DNA-vermittelter Transfektion blieb die Transgenexpression auf hohem Niveau für über 300 Tage, wobei hierbei maximale Werte von über 50.000 ng/ml RT1.Aa gemessen werden konnten.

Nach adenovirus-vermittelter Transfektion wurden anfänglich Werte über 1500 ng/ml erreicht. Höhere Adenovirusdosen führte zu Expression bis zu

10000 ng/ml, waren aber mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Die anfänglich hohe Expressionsrate fiel mit der Zeit ab und war nach 10-14 Tagen nicht mehr nachweisbar.

Nach der Transfektion mit dem Kontroll-Plasmid, das keine AAV-ITR enthält, wurden zunächst ebenfalls hohe Expressionsniveaus erreicht, jedoch konnte im Vergleich zu AAV-ITR-enthaltenden Plasmiden oder AAV im Verlauf ein deutlicher Abfall der Expression detektiert werden.

Zum Nachweis einer funktionalen Expression von RT1.Aa führten wir schließlich an transfizierten Tieren allogene Herztransplantationen durch. Hierbei kommt es durch die immunsuppressive Wirkung von löslichem RT1.Aa zu einer Überlebenszeitverlängerung des Herztransplantats. Sowohl nach Transfektion mittels AAV, als auch nach Transfektion mittels AAV-Plasmiden, konnte eine Überlebenszeitverlängerung nach allogener Herztransplantation nachgewiesen werden. Somit konnte auch nach AAV-Plasmid-vermitteltem Gentransfer eine funktionale Expression nachgewiesen werden.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass die Verwendung von AAV-Plasmiden im Vergleich zu rekombinantem AAV in Bezug auf den *in vivo* Gentransfer der Leber zumindest im Nagermodell gleichwertig ist. Im Vergleich zu Erstgenerationsadenoviren sind AAV-Plasmide bezüglich der Expressionsdauer überlegen.

Diskussion

Seit der ersten Beschreibung der so genannten "hydrodynamics-based transfection" im Jahr 1999 durch Liu *et al.* [22], bei der Plasmid-DNA in einem großen Volumen (10% des Körpergewichts) über die Schwanzvene von Mäusen injiziert wird, wurden inzwischen vor allem wegen der Einfachheit und Effektivität der Methode sehr viele Studien unter Verwendung dieses Verfahrens durchgeführt [24-27]. Zusätzlich wurde

2004 durch Inoue *et al.* eine Modifikation der Methode eingeführt, wodurch das notwendige Injektionsvolumen reduziert werden konnte, was insgesamt zu einer deutlich reduzierten Mortalität führte [28]. Dies zeigen auch unsere Ergebnisse: In unseren Versuchen starb durch Verwendung der modifizierten Methode kein Tier während der Transfektion.

Insgesamt zeigen unsere Versuche, dass durch hydrodynamischen Gentransfer mit AAV-Plasmiden eine hohe und langanhaltende Expression erreicht werden kann, der mit dem AAV-basierten Gentransfer (bezogen auf AAV Serotyp 2) vergleichbar ist. Aufgrund der längeren Expressionsdauer sind AAV-Plasmide adenoviralen Vektoren der ersten Generation überlegen; dies gilt analog für "normale" Plasmide ohne AAV-ITRs.

Die Transfektionseffizienz in der Leber nach hydrodynamischen Gentransfer wird in der Literatur mit ca. 40% beschrieben [22]. Das Verfahren ist damit etwa gleich wirksam gegenüber adenoviralem Gentransfer mit Erstgenerationsadenoviren [29]. Im Gegensatz hierzu erzielen jedoch neuere, sogenannte "gutless" adenovirale Vektoren 2- bis 5-fach höhere Expressionsraten [30]. Zusätzlich kann die Expression des Transgens mit diesen Vektoren zum Teil über 1 Jahr nach der Transfektion noch nachgewiesen werden. Damit stellt sich die Frage, ob die neueren adenoviralen Vektoren dem Plasmid-DNA-basierten Gentransfer überlegen sind. Diese Möglichkeit kann durch die vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden, auch wenn in unseren Versuchen die Verwendung von Plasmid-DNA im Vergleich zu Erstgenerationsadenoviren ebenfalls zu höheren Expressionsraten führte.

Im Gegensatz zu Adenoviren sind für den auch von uns verwendeten AAV Serotyp 2 in der Leber nur Transfektionseffizienzen zwischen 2-5% beschrieben; diese sind signifikant niedriger als die beschriebenen Wirkungsgrade nach hydrodynamischen Gentransfer [31, 32]. Diese Daten

werden durch unsere Experimente betätigt. Im Vergleich zu Plasmid-DNA fanden wir etwa 4-5-fach niedrigere Expressionraten nach AAV-vermittelten Gentransfer. Eine wesentliche Verbesserung der Expressionsraten, zumindest in Nagetiermodell, könnte mit dem Einsatz von alternativen AAV-Serotypen erreicht werden. Es ist bekannt, dass die Verwendung von AAV-Serotyp 8 im Vergleich zum Serotyp 2 zu 10- bis 20-fach höheren maximalen Expressionraten in der Leber führt [33]. Allerdings ist für den Serotyp 8 nach einem Expressionsmaximum nach ca. 3 Wochen ein Abfall auf ca. 30% der maximalen Expression beschrieben [33]. Darüber hinaus liegen mit dem AAV-Serotyp 8 in größeren Tieren oder Primaten nur begrenzte Erfahrungen vor. Wir haben daher die Ergebnisse nach AAV-Plasmid-DNA-vermittelter Transfektion mit denen nach AAV Serotyp 2 vermittelter Transfektion verglichen. Zusammengenommen ist jedoch durchaus möglich, dass die Verwendung von AAV Serotyp 8 der Transfektion mit AAV-Plasmiden überlegen ist.

In unseren Versuchen verwendeten wir 2 unterschiedliche Transfektionsverfahren: Plasmid-DNA wurde durch hydrodynamischen Gentransfer transfiziert, während die Transfektion von rekombinanten Viren durch "einfache" intravenöse Injektion erfolgte. Hierbei ist zu beachten, dass unterschiedliche Applikationsverfahren nicht nur zu unterschiedlichen maximalen Expressionraten führen können, sondern auch Unterschiede in der Expressionsdauer auftreten können. Eine neuere Untersuchung konnte nachweisen, dass der adenoviralem Gentransfer via hydrodynamischer Injektion anstelle von "normaler" Injektion zu einer erhöhte Expression führt. Allerdings bleiben die Expressionsniveaus in der gleichen Größenordnung [34]. Da unsere eigenen Ergebnisse bereits eine höhere Expression nach hydrodynamisch applizierter Plasmid-DNA im Vergleich zu "normal" applizierten rekombinanten Viren zeigen, erscheint eine signifikant höhere Expression nach hydrodynamisch appliziertem Virus gegenüber hydrodynamisch applizierter AAV-Plasmid-DNA unwahrscheinlich. Keine Unterschiede sind auch bei der Expressionsdauer

zu erwarten: Beim Vergleich des zeitlichen Verlaufs der humanen Faktor IX-Expression nach adenoviralem Gentransfer konnten Brunetti-Pierri *et al.* zeigen, dass die hydrodynamische Injektion die Dauer der Transgenexpression nicht beeinflusst [34].

Obwohl der hydrodynamische Gentransfer von Plasmid-DNA zu einer initial hohen Expression des Transgens führt, zeigen die meisten Studien, dass diese Expression im Zeitverlauf instabil ist. So zeigt sich beispielsweise nach Plasmid-DNA-vermitteltem Gentransfer von CTLA4-Ig in Ratten das Expressionsmaximum 2 Tage nach Transfektion; im Verlauf fällt dann die Expression auf ein niedriges Niveau ab [28, 35]. In einer anderen Studie konnte die Expression des humanen-alpha-1-Antitrypsin-Gen (hAAT) zwar für bis zu 6 Monate in Mäusen nachgewiesen werden, aber die anfänglich hohen Expressionsraten waren nach einer Woche stark rückläufig [36]. Diese Ergebnisse werden von unseren eigenen Kontrollexperimenten bestätigt, die einen ca. 100-fachen Abfall innerhalb von 1 Monat zeigen, wenn Plasmid-DNA ohne AAV-ITRs verwendet wird.

Zur Verlängerung der Expression nach Plasmid-DNA vermitteltem Gentransfer wurden bereits mehrere Veränderungen am "Design" der Plasmid-DNA beschrieben. So konnte Ochiai *et al.* eine schnelle Inaktivierung der häufig in Expressionsplasmiden verwendeten CMV-Promotors *in vivo* nachweisen [37]. Dies konnte zwar durch die Verwendung des natürlichen hAAT-Promotor verbessert werden, es zeigten sich leider jedoch auch deutlich niedrigere Expressionsniveaus [38]. Miao *et al.* beschrieben die Verwendung von sogenannten "specific control region sequences" (LCR) zur Verbesserung der Expression [39]. Chen *et al.* berichten eine verlängerte Transgenexpression nach Transfektion von sogenannten "Mini Circle DNA-Vektoren", die frei von allen bakteriellen DNA-Sequenzen sind [40, 41].

Trotz aller bisherigen Versuche zur Verbesserung des Vektordesigns zeigen die meisten Studien immer noch eine Abnahme der Transgenexpression im Zeitverlauf. Als Ursache wird angenommen, dass durch den natürlichen Turnover von Hepatozyten in der Leber mit einer geschätzten Halbwertszeit von 6-12 Monaten ein Verlust der nicht genomisch integrierten Transgen-DNA erfolgt [42]. Um die genomische Integration des jeweiligen Transgens zu erleichtern, wurden Systeme wie das "sleeping beauty system" [43-45] oder die Integration von sogenannten nuklearen scaffold / matrix attached regions (S / MAR) in Expressionsvektoren [46, 47] entwickelt. Ob hierdurch die Abnahme der Transgenexpression im Zeitverlauf verhindert werden kann, bleibt abzuwarten [42]

Im Gegensatz dazu konnte nach *in vivo* Transfektion mit rekombinanten AAV eine langfristige Expression bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden [48-51]. Obwohl rekombinanter AAV nicht in das Genom der Wirtszelle integriert, ist das Genom rekombinanter AAV im Zellkern von Maushepatozyten als sogenanntes "episomales Konkatemere" für mindestens 1,5 Jahren nachweisbar [52]. AAV-ITR-haltige Plasmide werden in die Zelle als doppelsträngige DNA aufgenommen und ähneln damit der Struktur des umgewandelten AAV-Genoms. Obwohl es unwahrscheinlich ist, dass die kreisförmige AAV-Plasmid-DNA analog zum linearen AAV-Genom in Konkatemere umgewandelt wird, besteht die Möglichkeit, dass die Existenz der AAV-ITRs eine stabilisierende Wirkung auf die transfizierte DNA hat. Dies könnte schließlich die von uns beobachtete, im Zeitverlauf stabile, Expression erklären.

Die bereits publizierten Daten zur Stabilität der Expression nach AAV-vermitteltem Gentransfer gelten nur für den Fall, dass im jeweils verwendeten Modell keine Leberregeneration stattfindet. In Modellen mit Leberregeneration ist die Expression instabil, unabhängig von der Verwendung von rekombinantem AAV oder AAV-Plasmid-DNA für den

Gentransfer [53-55]. Es ist bekannt, dass ein hydrodynamischer Gentransfer in die Leber eine Gewebsschädigung mit anschließender Leberproliferation induziert, sodass als Folge im vorliegenden Modell eigentlich eine Abnahme der Expression im Zeitverlauf anzunehmen wäre. Obwohl das Ausmaß der Gewebeschädigung in unserem System als eher beschränkt anzusehen und deutlich geringer als bei hydrodynamischen Injektion über die Schwanzvene ist [28], kann auch die Möglichkeit einer bevorzugten genomischen Integration der ITR-enthaltenen Plasmide, die die stabile Expression trotz Leberproliferation erklären würde, nicht ausgeschlossen werden. Dies ist insofern von Bedeutung, da wir Expressionsniveaus von Plasmid-DNA nach hydrodynamischen Gentransfer mit Expressionsniveaus von rekombinanten Viren nach "normalem" Gentransfer verglichen haben. Zur Klärung dieser Frage untersuchten Nakai *et al.* in einem Leberproliferationsmodell der Maus die genomische Integration verschiedener DNA-Konstrukte nach hydrodynamischem Gentransfer, unter anderem auch Plasmide mit und ohne AAV-ITRs. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen ITR-enthaltenden und ITR-freien, zirkulären Plasmiden, wie sie auch von uns verwendet wurden [54].

Auf dem Weg zur klinischen Anwendung des hydrodynamischen Gentransfers sind weitere Entwicklungsschritte notwendig. Große Tierstudien zeigen, dass diese Gentransfermethode bei Schweinen deutlich weniger effizient (<30-fach) als bei Nagetieren ist [56, 57]. Allerdings berichten Brunetti-Pierri *et al.* über eine modifizierte Form des hydrodynamischen Gentransfers unter Verwendung von rekombinanten "gutless" adenoviralen Vektoren. Hierbei kann in Pavianlebern die langfristige Expression therapeutischer Mengen des α -Fetoprotein bis zu 3 Jahre nachgewiesen werden [58]. Eine Anwendung von Plasmid-DNA mittels hydrodynamischen Gentransfer am Menschen ist bisher nicht beschrieben, aber Manno *et al.* berichteten 2006 über die Ergebnisse einer menschlichen Phase 1-Studie nach AAV-vermitteltem Gentransfer von

Faktor IX in die Leber. Leider konnte hierbei keine langfristige Faktor IX-Expression erreicht werden. Möglicherweise war aufgrund von Immunantworten gegen AAV-Kapsidproteine die Expression des Transgens auf etwa acht Wochen beschränkt [21].

Obwohl noch keine praktischen Erfahrungen mit dem Plasmid-DNA-vermittelten Gentransfer im Menschen vorliegen, bietet der aktuelle Ansatz einige wichtige Vorteile gegenüber der Verwendung von rekombinanten AAV: Die Methode ist einfach, was zumindest theoretisch die Kosten pro Dosis deutlich reduziert [20, 59, 60]. Im Gegensatz zu rekombinantem AAV gibt es keine Beschränkung der Größe des zu klonierenden Transgens. Zusätzlich ist eine Immunisierung gegen virale Kapsidproteine aufgrund des Fehlens derselben in Plasmid-DNA-Präparationen nicht möglich.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass zumindest im Rattenmodell eine funktionale und langfristige Genexpression nach Plasmid-DNA-vermitteltem Leber-Gentransfer möglich ist. Inzwischen wurde die Methode des hydrodynamischen Gentransfers in mehreren Großtiermodellen erfolgreich angewandt, wodurch sie auch klinisch anwendbar erscheint [42, 61, 62]; die zusätzliche Verwendung von AAV-ITR-haltigen Plasmiden, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, kann hierbei zu einer weiteren Verbesserung der Ergebnisse zukünftiger klinischer Studien führen.

Literatur

1. Doenecke A. Entwicklung und Anwendung von adeno-assoziierten virus-basierten Vektoren in der somatischen Gentherapie: Habilitation, Regensburg, 2011.
2. Cline MJ, Stang H, Mercola K, *et al.* Gene transfer in intact animals. *Nature* 1980; **284**: 422-425.
3. Friedmann T. Progress toward human gene therapy. *Science* 1989; **244**: 1275-1281.
4. Park F, Ohashi K, Kay M. Therapeutic levels of human factor VIII and IX using HIV-1-based lentiviral vectors in mouse liver. *Blood* 2000; **96**: 1173-1176.
5. Vandendriessche T, Vanslembrouck V, Goovaerts I, *et al.* Long-term expression of human coagulation factor VIII and correction of hemophilia A after *in vivo* retroviral gene transfer in factor VIII-deficient mice [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 10379-10384.
6. Ilan Y, Saito H, Thummala N, Chowdhury N. Adenovirus-mediated gene therapy of liver diseases. *Semin Liver Dis* 1999; **19**: 49-59.
7. Block A, Freund C, Chen S, *et al.* Gene therapy of metastatic colon carcinoma: regression of multiple hepatic metastases by adenoviral expression of bacterial cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 438-445.
8. Drozdzik M, Qian C, Xie X, *et al.* Combined gene therapy with suicide gene and interleukin-12 is more efficient than therapy with one gene alone in a murine model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000; **32**: 279-286.
9. Sauter B, Martinet O, Zhang W, Mandeli J, Woo S. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin *in vivo* results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 4802-4807.
10. Sarkar R, Gao G, Chirmule N, Tazelaar J, Kazazian H. Partial correction of murine hemophilia A with neo-antigenic murine factor VIII. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 881-894.
11. Aurisicchio L, Delmastro P, Salucci V, *et al.* Liver-specific alpha 2 interferon gene expression results in protection from induced hepatitis. *J Virol* 2000; **74**: 4816-4823.
12. Lehmann T, Wheeler M, Schoonhoven R, Bunzendahl H, Samulski R, Thurman R. Delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase genes with a viral vector minimizes liver injury and improves survival after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 2000; **69**: 1051-1057.
13. Shinozaki K, Yahata H, Tanji H, Sakaguchi T, Ito H, Dohi K. Allograft transduction of IL-10 prolongs survival following orthotopic liver transplantation. *Gene therapy* 1999; **6**: 816-822.
14. DeMatteo R, Chu G, Ahn M, *et al.* Immunologic barriers to hepatic adenoviral gene therapy for transplantation. *Transplantation* 1997; **63**: 315-319.

15. Yang Y, Wilson J. Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4⁺ CTLs *in vivo*. J Immunol 1995; **155**: 2564-2570.
16. Yang Y, Nunes F, Berencsi K, Furth E, Gonczol E, Wilson J. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; **91**: 4407-4411.
17. Chirmule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. Gene therapy 1999; **6**: 1574-1583.
18. Gao G, Yang Y, Wilson J. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver- directed gene therapy. J Virol 1996; **70**: 8934-8943.
19. Kochanek S, Clemens P, Mitani K, Chen H, Chan S, Caskey C. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; **93**: 5731-5736.
20. Watson R, Health D. The Vector Directory: An Analysis of international GMP Gene Therapy Vector Capacity and Capability. 2007.
21. Manno C, Pierce G, Arruda V, *et al*. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nat Med 2006; **12**: 342-347.
22. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. Gene therapy 1999; **6**: 1258-1266.
23. Doenecke A, Frank E, Scherer MN, Schlitt HJ, Geissler EK. Prolongation of heart allograft survival after long-term expression of soluble MHC class I antigens and vIL-10 in the liver by AAV-plasmid-mediated gene transfer. Langenbecks Arch Surg 2008; **393**: 343-348.
24. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, *et al*. Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation. Transplantation 2002; **73**: 1403-1410.
25. Schmitz V, Barajas M, Wang L, *et al*. Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma. Hepatology (Baltimore, Md 2001; **34**: 72-81.
26. Yang Z, Wu X, Tsui TY, Hou Y, Luk JM, Fan ST. Long-term liver allograft survival induced by combined treatment with rAAV-hCTLA4Ig gene transfer and low-dose FK506. Transplantation 2003; **75**: 303-308.
27. Yang ZF, Wu XB, Tsui TY, Hou YD, Luk JM, Fan ST. Recombinant adeno-associated virus vector: Is it ideal for gene delivery in liver transplantation? Liver Transpl 2003; **9**: 411-420.
28. Inoue S, Hakamata Y, Kaneko M, Kobayashi E. Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA: application to the rat liver. Transplantation 2004; **77**: 997-1003.

29. de Roos WK, Fallaux FJ, Marinelli AW, *et al.* Isolated-organ perfusion for local gene delivery: efficient adenovirus-mediated gene transfer into the liver. *Gene therapy* 1997; **4**: 55-62.
30. Morral N, O'Neal W, Rice K, *et al.* Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 12816-12821.
31. Snyder R, Miao C, Patijn G, *et al.* Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997; **16**: 270-276.
32. Xiao W, Berta SC, Lu MM, Moscioni AD, Tazelaar J, Wilson JM. Adeno-associated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1998; **72**: 10222-10226.
33. Davidoff AM, Gray JT, Ng CY, *et al.* Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther* 2005; **11**: 875-888.
34. Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Mane V, Finegold M, Beaudet AL, Ng P. Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* 2005; **12**: 99-106.
35. Takekubo M, Tsuchida M, Haga M, *et al.* Hydrodynamics-based delivery of plasmid DNA encoding CTLA4-Ig prolonged cardiac allograft survival in rats. *The journal of gene medicine* 2007.
36. Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene therapy* 2000; **7**: 1344-1349.
37. Ochiai H, Harashima H, Kamiya H. Intranuclear disposition of exogenous DNA *in vivo*: silencing, methylation and fragmentation. *FEBS letters* 2006; **580**: 918-922.
38. Alino SF, Crespo A, Dasi F. Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene therapy* 2003; **10**: 1672-1679.
39. Miao CH, Ye X, Thompson AR. High-level factor VIII gene expression *in vivo* achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 1297-1305.
40. Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol Ther* 2003; **8**: 495-500.
41. Chen ZY, He CY, Meuse L, Kay MA. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements *in vivo*. *Gene therapy* 2004; **11**: 856-864.
42. Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene therapy* 2007; **14**: 99-107.
43. Hackett PB, Ekker SC, Largaespada DA, McIvor RS. Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Advances in genetics* 2005; **54**: 189-232.

44. Masuda K, Yamamoto S, Endoh M, Kaneda Y. Transposon-independent increase of transcription by the Sleeping Beauty transposase. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; **317**: 796-800.
45. Mikkelsen JG, Yant SR, Meuse L, Huang Z, Xu H, Kay MA. Helper-Independent Sleeping Beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression *in vivo*. *Mol Ther* 2003; **8**: 654-665.
46. Jenke AC, Stehle IM, Herrmann F, *et al.* Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 11322-11327.
47. Piechaczek C, Fetzter C, Baiker A, Bode J, Lipps HJ. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 426-428.
48. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 2005; **99**: 119-145.
49. Grimm D, Kay MA. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Current gene therapy* 2003; **3**: 281-304.
50. High K. AAV-mediated gene transfer for hemophilia. *Genet Med* 2002; **4**: 56S-61S.
51. Wang L, Herzog RW. AAV-mediated gene transfer for treatment of hemophilia. *Current gene therapy* 2005; **5**: 349-360.
52. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol* 2001; **75**: 6969-6976.
53. Conlon TJ, Cossette T, Erger K, *et al.* Efficient hepatic delivery and expression from a recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped alpha1-antitrypsin vector. *Mol Ther* 2005; **12**: 867-875.
54. Nakai H, Montini E, Fuess S, *et al.* Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol Ther* 2003; **7**: 101-111.
55. Wang J, Xie J, Lu H, *et al.* Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 13104-13109.
56. Fabre JW, Grehan A, Whitehorne M, *et al.* Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene therapy* 2008; **15**: 452-462.
57. Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene therapy* 2006; **13**: 1696-1702.
58. Brunetti-Pierri N, Stapleton GE, Law M, *et al.* Efficient, long-term hepatic gene transfer using clinically relevant HDAd doses by balloon

- occlusion catheter delivery in nonhuman primates. *Mol Ther* 2009; **17**: 327-333.
59. Danos O. AAV gene vector manufacturing : what is feasible now and in the near future?: Monte Carlo, 2006.
 60. Hebel H, Attra H, Khan A, Draghia-Akli R. Successful parallel development and integration of a plasmid-based biologic, container/closure system and electrokinetic delivery device. *Vaccine* 2006; **24**: 4607-4614.
 61. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, *et al*. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther* 2004; **10**: 386-398.
 62. Wells DJ. Opening the floodgates: clinically applicable hydrodynamic delivery of plasmid DNA to skeletal muscle. *Mol Ther* 2004; **10**: 207-208.

Originalarbeit

AAV plasmid DNA simplifies liver-directed *in vivo* gene therapy: comparison of expression levels after plasmid DNA-, adeno-associated virus- and adenovirus-mediated liver transfection

Axel Doenecke*
Alexander Krömer
Marcus N. Scherer
Hans-Jürgen Schlitt
Edward K. Geissler

University Medical Center
Regensburg, Department of Surgery,
Regensburg, Germany

*Correspondence to: Axel Doenecke,
University Medical Center
Regensburg, Department of Surgery,
Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053
Regensburg, Germany.
E-mail: axel.doenecke@klinik.
uni-regensburg.de

Abstract

Background Successful liver gene therapy depends on efficient gene transfer techniques and long-lasting gene expression after successful transfer. Over the last decades, important progress has been made with the introduction of viral vectors using animal models, although their use is hampered by a complex and costly preparation compared to the simple and cost-effective preparation of plasmid DNA. These problems become even more critical when considering the application of viral vectors in human gene therapy and gene therapy trials. In a previous study, we were able to show that the hydrodynamics-based gene transfer of plasmid-DNA, containing the adeno-associated-virus specific inverted terminal repeats (AAV-ITR), prolongs gene expression in the liver, although it remained unclear whether plasmid gene transfer could achieve similar expression levels compared to viral-vector gene transfer.

Methods Rat livers were transfected *in-vivo* with AAV-ITR-containing plasmid-DNA using a modified hydrodynamics-based procedure. Expression levels were monitored thereafter and compared with expression levels after viral-vector gene transfer.

Results A high and stable long-term expression was achieved after *in vivo* transfection of rat livers with AAV-ITR-containing plasmids. The expression course resembled that after AAV-mediated gene transfer, and the expression was at least as high, and lasted as long, compared to recombinant AAV-mediated gene transfer.

Conclusions We consider AAV-ITR-containing plasmids as a simple and cost-effective alternative to recombinant viral vectors, especially for liver-directed gene therapy in rodents. With ongoing progress in gene transfer methods for naked DNA, these plasmids may also become a successful alternative to recombinant viral vectors in human gene therapy. Copyright © 2010 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords AAV plasmid; *in vivo* gene therapy; naked DNA gene transfer; nonviral gene transfer

Received: 23 March 2010
Revised: 30 July 2010
Accepted: 2 August 2010

Introduction

Besides muscle tissue, the high-protein producing liver is an important target for systemic *in vivo* gene therapy. After transfection with viral vectors, high and long-lasting expression has been demonstrated in several studies [1–4]. On the way to clinical use, however, viral vectors have been associated with several problems, which are still unsolved [5–8]. Besides high production costs, side effects and the development of neutralizing antibodies have led to early termination of several clinical studies with viral vectors [6,7]. A possible solution could be the use of plasmid-DNA because large-scale production is relatively simple and the anticipated side effects are low [9]. Efficient *in vivo* transfection of the liver by plasmid-DNA has already been demonstrated in rodents by hydrodynamics-based methods [10–18]. However, most studies report only short-term expression that maybe a result of the lack of plasmid-DNA persistence in the cell nucleus. This lack of persistence can possibly be addressed by the use of adeno-associated-virus (AAV) plasmids, where the coding sequences of the respective transgene are cloned between the AAV-specific inverted terminal repeats (ITRs). Recombinant (r)AAV does not appear to integrate into the genome at a specific site [19], although long-term expression after AAV-mediated gene transfer has been described in several studies [19–22]. After transfection, the single-stranded AAV genome is converted into double-stranded DNA, which then exists in the nucleus in an episomal form [19]. This form is probably imitated by the direct gene transfer of AAV-ITR-containing plasmids, which is an idea supported by our recent findings that *in vivo* gene transfer with these plasmids leads to prolonged expression [23]. It remains unclear, however, whether transfection with these plasmids results in the same expression course and level as rAAV.

In the present study, we analyzed the expression course of the DA-rat specific soluble major histocompatibility complex (MHC) class I-antigen RT1.A^a in livers of human leukocyte antigen-disparate Lewis-rats after gene transfer with AAV-ITR-plasmid-DNA, and compared these results with the expression course after AAV-mediated gene transfer. Plasmid-DNA, containing no AAV-ITR, as well as a first-generation recombinant adenovirus known for its initially high, but only temporary, expression, served as controls for production levels.

Materials and methods

Preparation of adenoviral vectors (AdV)

The pAdEasy system, originally described and kindly provided by He *et al.* [24] was used to develop our AdV constructs. To produce rAAV, HEK293 cells ($1.5 \times 10^6/25 \text{ cm}^2$ flask) were transfected with *PacI* linearized recombinant plasmids (4 μg of linear plasmid/20 μl Lipofectamine; Life Technologies, Karlsruhe, Germany). Transfected cells were harvested after a 7-day incubation period at 37°C and cell lysates were then used for infection of fresh HEK293 cells. High-titer viral vector stocks were purified by CsCl ultracentrifugation after four or five rounds of amplification. Finally, viral vector titers were determined using a limiting-dilution assay, as modified from the methods described by Nyberg-Hoffman *et al.* [25]. For this assay, a chi-square minimization analysis was performed to calculate the frequency of infectious particles and the number of fluorescent forming units (ffu).

Construction of AAV plasmids

To construct an AAV-expression plasmid for soluble RT1.A^a, the respective genes were cloned using standard techniques into the AAV plasmid pSUB201 [26], under the control of the mouse albumin promoter. Construction of the soluble RT1.A^a-gene has been described previously [27]. The resulting plasmid was named pSA-RQ (RT1.A^a). The control plasmid pSA-RQ (-ITR) was constructed by digesting and religating pSA-RQ with *BssHIII*, thereby excising an 85-bp segment containing the functional domains in both AAV-ITR-sequences. The 'empty plasmid' termed pSA-empty (i.e. containing no gene), was used as further control. Plasmid DNA was purified with an EndoFree Giga Plasmid preparation kit (Qiagen, Hilden, Germany). The plasmids are shown in Figure 1.

Production of rAAV

rAAV were produced in HEK293 cells according to a modified adenovirus-free method [28,29]. For one rAAV vector preparation, eight 500-cm² bioassay dishes

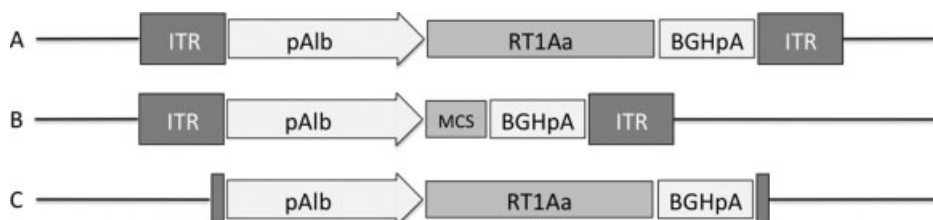


Figure 1. AAV plasmids containing the soluble RT1.A^a gene. pSA-RQ (A) was constructed by cloning the soluble RT1.A^a gene into the AAV plasmid pSUB201, under the control of the mouse albumin promoter. The control plasmid (pSA-empty) (B) was the same plasmid without an insert. pSA-RQ (-ITR) was constructed by excising the AAV-ITR sequences out of plasmid pSA-RQ (C)

(Corning, Acton, MA, USA) containing approximately 3×10^8 HEK293 cells were triple-transfected with 200 µg of the packaging plasmid, pRC [30], 600 µg of the helper plasmid pXX6–80 [29] and either 200 µg of pSA-empty or 200 µg of pSA-RQ.

Medium [Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal calf serum] was changed the following day, and cells were harvested 60 h after transfection. Cells from eight dishes were resuspended in a total volume of 70 ml of serum-free medium, frozen, thawed two times, and incubated with 0.1 mg each of DNase I and RNase A (Roche Biochemicals, Mannheim, Germany) for 30 min at 37 °C. After centrifugation at 4 °C, the supernatant was transferred into a new tube, incubated with 0.5% (final concentration) deoxycholic acid (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for 30 min at 37 °C, and sequentially filtered through a 5-mm pore size filter and then a 0.8-mm pore-size filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The cleared crude lysate was then purified with 8 ml of heparin-agarose (Sigma-Aldrich) by affinity-column-chromatography. After calibration with 25 ml of phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), the filtered crude lysate was applied to the column with a flow speed of approximately 1 drop/s. The matrix was washed twice with 25 ml of PBS (pH 7.4) containing 0.254M NaCl. The viral vectors were then eluted with 15 ml of PBS (pH 7.4) containing 0.4 M NaCl. The eluate was concentrated to approximately 1 ml with an Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Device (NMWL 100 kDa; Millipore). To adjust the NaCl concentration to physiological levels, the filter device was refilled with PBS (pH 7.4) and the viral vector was concentrated to 1 ml.

The viral vector titers per preparation was determined by real-time polymerase chain reaction, as described previously [31]. A typical preparation from eight 500-cm² dishes resulted in approximately 10^{12} – 10^{13} viral particles.

Allogeneic heterotopic heart transplantation

Male Lewis and ACI rats were obtained from Harlan Sprague-Dawley (Hannover, Germany). ACI heterotopic cardiac transplants were performed in Lewis recipients (200–250 g) using a modification of the technique originally described by Ono and Lindsey [32]. Briefly, ACI donor hearts were placed into the recipient's abdomen and the pulmonary artery of the donor heart was sutured end-to-side to the recipient vena cava; the donor aorta was sutured using the same technique to the recipient abdominal aorta. Graft rejection time was defined as the time at which no cardiac contractions were palpable; rejection was verified by direct inspection of the allograft via laparotomy. A standard log-rank analysis was performed to determine statistical significance of the survival data after heart transplantation.

Animals

All animal care and procedures were performed using criteria outlined in the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' prepared by the National Academy of Sciences and the National Institutes of Health and were approved by the Animal Care Committee of the Oberpfalz, Germany. Rats were cared for in accordance with institutional guidelines and according to the German Animal Protection Law.

Application of recombinant (r)AdV and rAAV

rAdV preparations, as well as rAAV preparations, were injected in a total volume of 500 µl of PBS (pH 7.4) via the portal vein after laparotomy.

Retrograde injection of plasmid-DNA into the rat liver

A modified procedure originally described by Inoue *et al.* [10] was used to transfect rat livers with plasmid-DNA. After cannulation of the inferior vena cava (IVC; caudal to the renal veins) using a 1-mm silicon tube, the supra-hepatic IVC was cross-clamped with a Satinsky clamp, and a 4/0 silk suture was wrapped around the infrahepatic suprarenal IVC and microclipped. Then, 125 µg of plasmid-DNA (diluted in PBS; 2.5% of rat body weight) was rapidly injected within 5–10 s.

Determination of RT1.A^a expression

An RT1.A^a-specific ELISA was used to measure RT1.A^a levels as described previously [27]. Briefly, a 96-well half-area plate was coated with the RT1.A^a-specific monoclonal antibody R2/155 (Serotec, Eching, Germany) and captured RT1.A^a was detected with OX-18-biotin (Serotec), which is a monoclonal antibody specific for a monomorphic determinant of RT1.A^a. The complex was detected with streptavidin horseradish peroxidase and the plate was analyzed at 490 nm with an automated microplate reader. To quantitate the concentration of RT1.A^a, a linear regression analysis was performed using purified RT1.A^a antigen as a standard.

Culturing of HEK293 cells

HEK 293 cells (Clontech, Mountain View, CA, USA) were cultured in DMEM supplemented with 100 units/ml penicillin G sodium, 100 mg/ml streptomycin, 4 mM L-glutamine, and 10% fetal bovine serum at 37 °C in a 5% CO₂-containing humidified incubator. Cell cultures were split every 2–4 days by trypsinization, when they reached 70–80% confluency.

Results

Male Lewis rats (190–250 g body weight) were transfected *in vivo* with pSA-RQ plasmids using the described retrograde injection via the vena cava, or by intraportal injection of AAV-RQ or AdV-RQ. Serum levels of soluble RT1.A^a were subsequently measured over time by periodical blood drawings. In the preceding experiments, dose–response-curves were generated to find the optimal amount of DNA or viral vector for maximum expression (Figure 2). The required amounts were 125 µg of plasmid-DNA (equivalent to 1.5×10^{13} DNA molecules), 1×10^{13} genomic particles of AAV (equivalent to 2×10^{11} infectious particles) and 2×10^9 pfu (equivalent to 1×10^{11} genomic particles) of AdV-RQ. These amounts were used for the described experiments.

After transfection of AdV-RQ and pSA-RQ-plasmid-DNA, high expression levels were detected in serum from day 1 onward, whereas expression levels after

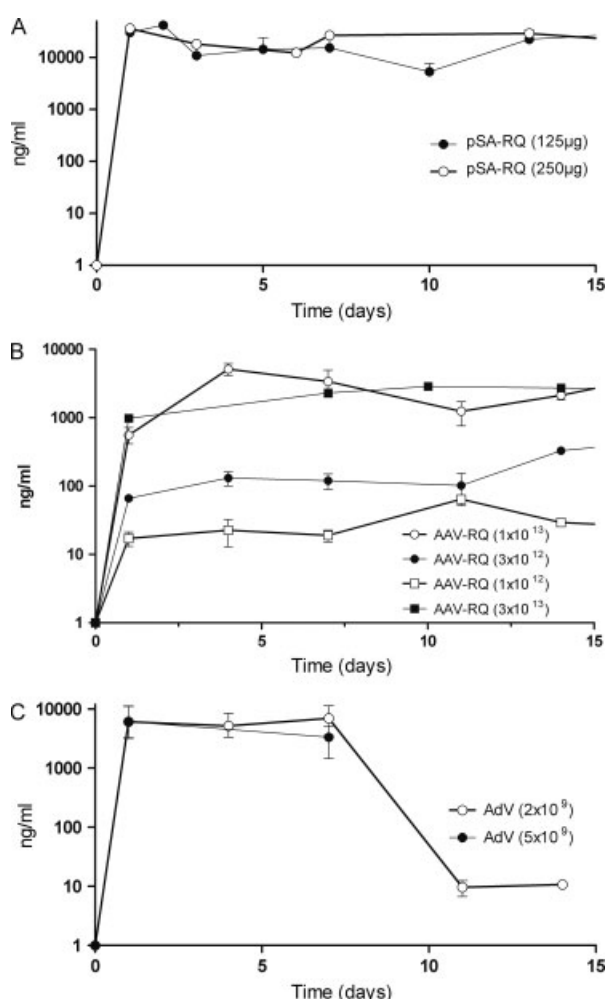


Figure 2. Dose-response-curves after *in vivo* gene transfer of AAV plasmid-DNA (A), AAV-vectors (B) and adenoviral vectors (C). For plasmid-DNA, a similar analysis already has been performed by Inoue *et al.* [10], showing maximum expression levels at a minimum of 1256 g of DNA/rat. The same is true in our system. For gene transfer with AdV-RQ, a minimum amount of 2×10^9 ffu/rat is necessary, as previously reported [11]

rAAV-mediated transfection achieved its maximum only after 4–5 days. In the case of rAAV and AAV plasmid-DNA-mediated transfection, transgene expression remained at high level for over 300 days (Figure 3), and maximum levels over 50 000 ng/ml were detected. After rAdV-mediated transfection, levels over 1500 ng/ml of soluble RT1.A^a were achieved. Higher doses of rAdV led to expression levels up to 10 000 ng/ml, although these were associated with significant toxicity, consistent with a previous study [33]. After transfection with the control plasmid pSA-RQ (-ITR), which contains no AAV-ITR, the same high expression levels were initially detected (as with pSA-RQ), although these levels dropped significantly over time, indicating an accelerated cellular loss of the transfected DNA. As expected, *in vivo* transfection with control plasmid or control viral vector did not result in detectable soluble RT1.A^a expression.

In previous studies, we have demonstrated the immunosuppressive effect of soluble RT1.A^a molecules in rat heart transplantation. After AdV-mediated transfection *in vivo*, a slight prolongation of heart allograft survival has been shown in the strong responder combination, DA-to-Lewis [11,33,34]. In the present study, we tested for functional expression of soluble RT1.A^a after rAAV and AAV plasmid-DNA-mediated transfection by similarly performing allogeneic DA-to-Lewis heart transplantation after rAAV and AAV plasmid-mediated gene therapy. Consistent with our previous data after rAdV-mediated gene transfer, a positive effect on allograft survival can only be detected if AAV plasmid-DNA or rAAV is injected several days before heart transplantation. Note that the time period between gene transfer and heart transplantation differed with rAdV, rAAV or AAV plasmid-DNA use because delayed gene expression with rAAV required earlier application (day –15) than with rAdV (day –7) or AAV plasmid-DNA (day –6). As demonstrated in Table 1, a small, but significant prolongation of heart allograft survival was detected, independent of the gene transfer method, indicating functional expression of the transferred gene in all cases.

Taken together, the results obtained in the present study demonstrate that gene transfer of the soluble rat MHC I-antigen RT1.A^a using AAV plasmids via retrograde perfusion of the liver leads to equally high, long-lasting and functional, gene expression when directly compared to conventional adenoviral vector- or AAV-based gene transfer.

Discussion

Subsequent to the first description of the so-called 'hydrodynamics-based transfection' in 1999 [35], where Liu *et al.* [35] were able to demonstrate *in vivo* transfection of the liver after injection of plasmid DNA in a large volume into the tail vein of mice, hundreds of studies have been published using this method [12,15–18], mainly because of its effectiveness and simplicity. A modification was introduced in 2004 by Inoue *et al.* [10]

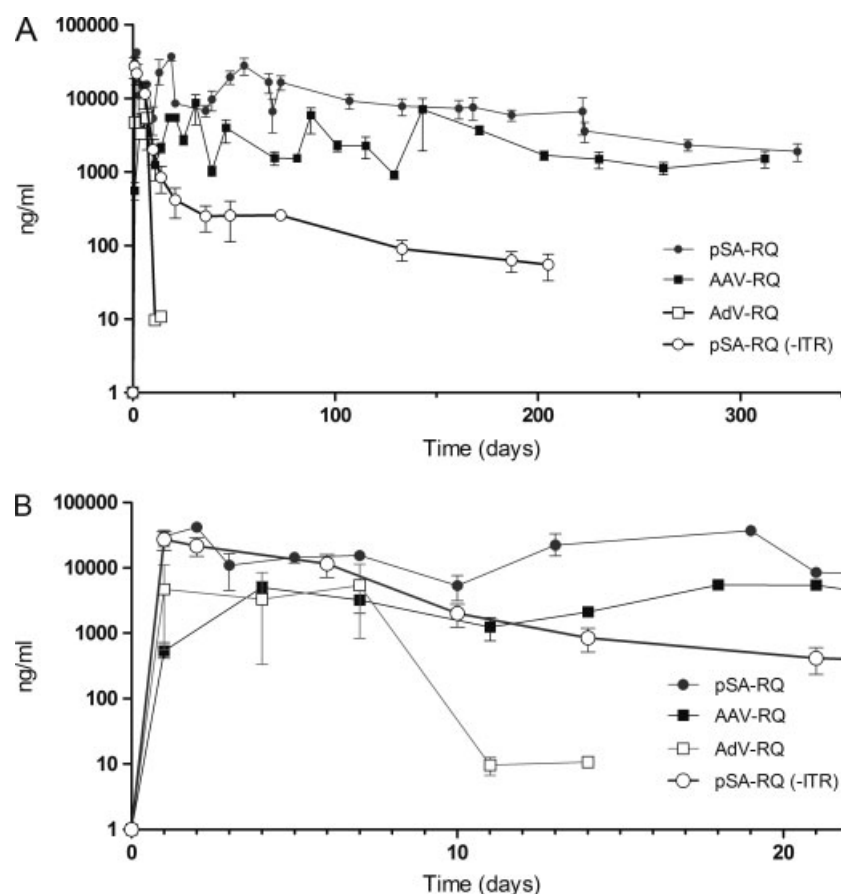


Figure 3. Expression of RT1.A^a after transfection of Lewis-rat livers with recombinant adenovirus (2×10^9 pfu/rat), rAAV (1013 genomic copies/rat), AAV plasmid-DNA (pSA-RQ, 1256 g/rat) or plasmid-DNA containing no AAV-ITR [pSA-RQ (-ITR), 1256 g/rat]. After transfection with AAV-RQ and plasmid pSA-RQ, expression levels remain high for at least 11 months. By contrast, transfection with the first generation adenovirus AdV-RQ led to only short-term expression. Transfection with pSA-RQ (-ITR) led to an initially high expression, although expression levels dropped approximately 100-fold over the first 30 days. (A) Long-term expression data. (B) Short-term expression data

Table 1. Functional effects of the gene transferred soluble RT1.A^a: survival of DA-to-Lewis heart allografts after rAdV, rAAV or AAV plasmid-mediated gene therapy *in vivo*

Plasmid-DNA	Day of injection ^a	Survival	Statistics (log rank) ^b
no gene transfer	–	6, 6, 6, 6	
pSA-empty	–6	5, 6, 6, 6	
pSA-RQ	–6	6, 6, 7, 7, 8, 10	0,030
pSA-RQ	–2	4, 6, 6	
AdV-empty	–7	6, 6, 6	
AdV-RQ	–7	7, 9, 10	0,025
AdV-RQ	–1	6, 6, 6, 6	
AAV-empty	–15	6, 6, 6, 6	
AAV-RQ	–15	7, 7, 10	0,014
AAV-RQ	–11	6, 6, 6	

^aday of injection vs. day of heart transplantation.

^bversus empty plasmid/virus.

A significant prolongation of heart allograft survival was detected after transfection of the soluble RT1.A^a, independent of the vector system used. Note that the time period between gene transfer and heart transplantation is essential for function because delayed gene expression with rAAV required earlier application (day–15) than with rAdV (day–7) or AAV plasmid-DNA (day–6). The duration of heart allograft survival after allogeneic HTx is indicated, as measured by a palpable pulse of the transplanted heart.

who directly injected plasmid DNA into the inferior vena cava after clamping the suprahepatic vena cava. The necessary volume could thereby be reduced, leading to less mortality at the same time as maintaining transfection efficiency [10]. In our own experiments, no animal died from injection volume-related problems, and all animals showed high expression after gene transfer.

Our experiments show that hydrodynamics-based transfection with AAV-ITR-containing plasmids is at least as effective as adenoviral vector gene transfer (first-generation adenoviral vectors) and as effective as AAV-based transfer with AAV serotype 2. By contrast to no-AAV-ITR containing plasmids, the initially high expression levels remain stable over time.

In general, a transfection efficiency of approximately 40% using hydrodynamics-based gene transfer has been described [35]. This method is equally effective compared to published transfection efficiencies after adenoviral-mediated gene transfer; efficiencies of about 40% have been described with a first-generation adenoviral vector in a rat model [36].

Higher expression levels and transfection efficiencies can be achieved with newer, 'gutless', adenoviral vectors (two- to five-fold better) [37]. In addition, and opposite

to first-generation adenoviral vectors, expression can be detected for over 1 year after transfection. This raises the question of whether a significantly higher expression level could be achieved with the use of 'gutless' adenoviral vectors instead of first-generation adenoviral vectors compared to AAV plasmid-DNA. However, AAV plasmid-DNA also led to higher expression levels than first-generation adenoviral vectors, making a significant advantage of 'gutless' adenoviral vectors in terms of expression levels unlikely compared to AAV plasmid-DNA.

By contrast, transfection efficiencies of only 2–5% have been described after AAV-mediated liver-directed gene transfer with AAV serotype 2, which is significantly lower than the described efficiencies after hydrodynamics-based gene transfer [38,39]. These results are confirmed by our experiments, where we found an approximately four- to five-fold lower expression after AAV-vector-mediated gene transfer versus plasmid-DNA-mediated transfection.

A significant improvement for AAV-mediated liver-directed gene transfer, at least in rodents, could be achieved with the use of alternate AAV serotypes. It is well known that the use of AAV serotype 8 leads to an approximately ten- to 20-fold higher maximum expression levels compared to AAV serotype 2 [40]. However, opposite to AAV serotype 2, expression levels peak at approximately 3 weeks, and drop thereafter to approximately 30% of maximum expression levels, before reaching a steady-state level [40]. In addition, experiences with AAV serotype 8 in larger animals or primates are still limited because AAV serotype 2 is still the most widely used serotype. We therefore compared the results after AAV plasmid DNA-mediated transfection with those after AAV serotype 2 transfection.

When comparing transfection efficiencies, it is important to note that we used 2 different application procedures for plasmid-DNA and viral deliveries. In theory, different application procedures might not only lead to different maximum expression levels, but also to differences in duration of transgene expression. A recent comparison of expression levels after adenoviral gene transfer via hydrodynamic injection and regular injection in mice showed an increased expression after hydrodynamic injection of adenoviral vectors, although the expression levels remained in the same order of magnitude [41]. Similarly, our own results showed a higher expression after hydrodynamically applied plasmid DNA compared to conventionally applied viral vector. A significantly higher expression after hydrodynamically applied viral vector versus hydrodynamically applied AAV plasmid DNA appears therefore unlikely. This is also true for the duration of expression. When comparing the time course of hFIX-expression after adenoviral gene transfer, Brunetti-Pierri *et al.* [41] were able to show that hydrodynamic injection does not alter or compromise the duration of transgene expression.

Although the use of plasmid-DNA leads to initial high expression, most studies report that this expression is unstable over time. For example, expression of CTLA4-Ig after specific plasmid-DNA-mediated gene transfer in

rats peaks on day 2, and it decreases thereafter to low levels [10,42]. Expression levels of the human-alpha-1-antitrypsin gene (hAAT) could be detected for up to 6 months in mice in another study, although the high initial expression levels rapidly declined after 1 week [43]. These results are confirmed by our own experiments using pSA-RQ (-ITR) as a control vector, showing that expression levels drop by approximately 100-fold within 1 month.

Changes in plasmid vector design have been made to improve the duration of expression. Ochiai *et al.* [44] reported rapid inactivation of the commonly used CMV-promoter *in vivo*. By using the natural hAAT-promoter, expression of hAAT could be significantly extended [45] but with lower expression levels, unfortunately. Miao *et al.* [46] have described the use of specific locus control region sequences to improve expression. Chen *et al.* [47,48] have reported prolonged transgene expression after transfection of so-called 'mini circle DNA vectors', devoid of all bacterial DNA sequences. Nonetheless, most studies still report a decrease in expression levels over time, even with the progress that has been made with vector design. This decrease is considered to be related to the turnover of hepatocytes in the case of targeted liver tissue, with an estimated half-life of 6–12 months [12]. To overcome this problem, and to promote genomic integration, systems such as the 'sleeping beauty system' [49–51] or integration of so-called nuclear scaffold/matrix attached regions into expression vectors [52,53] have been developed. However, it remains unclear whether those systems prevent the decrease of expression levels over time [12].

By contrast, long term-expression *in vivo* has been demonstrated in many studies after *in vivo* transfection with rAAV [19–22]. Although rAAV does not appear to integrate into the genome at a high frequency, its genome remains in the nucleus of mouse hepatocytes as episomal concatemers for at least 1.5 years [54]. AAV-ITR-containing plasmids directly enter the cell as double-stranded DNA, thereby resembling the structure of the converted AAV genome. Although it is unlikely that the circular AAV plasmid DNA is converted into concatemers as the linear AAV genome, it might be assumed that the existence of the AAV-ITR has a stabilizing effect on the transfected DNA, finally leading to the observed stable long-term expression in our experiments.

It is important to note that the above results are obtained in nonregeneration liver models. In models of liver regeneration, expression levels are unstable, independent of the use of rAAV- or AAV-ITR-plasmid-DNA for gene transfer [55–57]. Nevertheless, hydrodynamic injection of plasmids is known to induce tissue damage with subsequent induction of liver proliferation. Although the extent of tissue damage is limited in our system and significantly lower than with hydrodynamic injection via the tail vein [10], there is the possibility of extended liver proliferation with preferred genomic integration of ITR-containing plasmids, eventually leading to a prolonged expression as a result of integration. This is especially

important when these results are compared against non-hydrodynamic delivery methods, as we did with our viral deliveries. To rule out this possibility, Nakai *et al.* [56] addressed this question in a mouse model of liver proliferation. After hydrodynamics based gene transfer of ITR(–)- and ITR(+)-containing plasmids carrying the FAH-gene, livers of FAH-deficient mice were analyzed for integration events of plasmid DNA sequences into the hepatocyte genome by southern blot analysis. No difference with respect to integration events between ITR(–)- and ITR(+)-containing plasmids was found, provided that the plasmids were used in circular form for transfection, as in our experiments.

Taking the hydrodynamics concept towards clinical application requires further development. Large animal studies show that, in pigs, this gene transfer method is significantly less efficient (<30-fold) than in rodents [58,59]. However, Brunetti-Pierri *et al.* [60] reported a modified form of hydrodynamics-based gene transfer using recombinant ‘gutless’ adenoviral vectors in baboon liver results in therapeutic levels of α -fetoprotein and long-term expression for up to 3 years [60]. In humans, no approach for liver-directed gene therapy with naked DNA has been described so far, but Manno *et al.* [61] report the expression of factor IX after AAV-mediated gene transfer to the liver, within the scope of a human phase 1 trial. Unfortunately, long-term expression could not be confirmed, and expression was limited to approximately 8 weeks, possibly as a result of immune responses against AAV capsid proteins [61].

Although little is known about the applicability of plasmid-DNA-mediated gene transfer for liver-directed human gene therapy, our current approach offers some important advantages over the use of rAAV, while retaining an equal transfection efficiency (at least in rodents). The method is simple, which likely will lead to significantly lower costs per dose in future human applications [62–64]. By contrast to rAAV, there is no length restriction of the cloned transgene and no immune response against viral capsid proteins has become apparent. Finally, plasmid-DNA-mediated gene transfer is not restricted to liver-directed gene therapy, and can be equally applied to other tissues (i.e. muscle).

In summary, our data show functional long-term expression after plasmid-DNA-mediated gene therapy to the rodent liver. As already noted in previous studies [12,65,66], liver-directed, hydrodynamics-based, gene transfer provides a clinically applicable protocol that, at least in part, has already been tested successful in large animals. The additional use of AAV-ITR-containing plasmids, as demonstrated in the present study, may help to further improve the results obtained in future clinical trials.

Acknowledgements

The authors like to thank E. Frank and A. Höhn for excellent technical assistance. Parts of this work were supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (RE 287/33-1, GR 1478/3-1

and 3-2) and by the ‘Regensburger Forschungsförderung in der Medizin’ (ReForM) by the University of Regensburg. The authors declare that they have no competing financial interests.

References

1. Nomura M, Yamashita K, Murakami M, *et al.* Induction of donor-specific tolerance by adenovirus-mediated CD40Ig gene therapy in rat liver transplantation. *Transplantation* 2002; **73**: 1403–1410.
2. Schmitz V, Barajas M, Wang L, *et al.* Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001; **34**: 72–81.
3. Yang Z, Wu X, Tsui TY, Hou Y, Luk JM, Fan ST. Long-term liver allograft survival induced by combined treatment with rAAV-hCTLA4Ig gene transfer and low-dose FK506. *Transplantation* 2003; **75**: 303–308.
4. Yang ZF, Wu XB, Tsui TY, Hou YD, Luk JM, Fan ST. Recombinant adeno-associated virus vector: is it ideal for gene delivery in liver transplantation? *Liver Transpl* 2003; **9**: 411–420.
5. Herzog RW, Cao O, Srivastava A. Two decades of clinical gene therapy – success is finally mounting. *Discov Med* 2010; **9**: 105–111.
6. Tan PH, Janes SE, Handa AI, Friend PJ. More trouble ahead; is gene therapy coming of age? *Expert Opin Biol Ther* 2008; **8**: 561–567.
7. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; **4**: 346–358.
8. Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 573–587.
9. Li SD, Huang L. Gene therapy progress and prospects: non-viral gene therapy by systemic delivery. *Gene Ther* 2006; **13**: 1313–1319.
10. Inoue S, Hakamata Y, Kaneko M, Kobayashi E. Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA: application to the rat liver. *Transplantation* 2004; **77**: 997–1003.
11. Graeb C, Justl M, Scherer MN, *et al.* Expression of high levels of soluble allogeneic major histocompatibility complex class I antigen by adenoviral gene transfer strongly inhibits allospecific cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Transplant Proc* 2002; **34**: 1398–1399.
12. Herweijer H, Wolff JA. Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Ther* 2007; **14**: 99–107.
13. Hodges BL, Taylor KM, Joseph MF, Bourgeois SA, Scheule RK. Long-term transgene expression from plasmid DNA gene therapy vectors is negatively affected by CpG dinucleotides. *Mol Ther* 2004; **10**: 269–278.
14. Ponder KP. Gene therapy for haemophilia. *Curr Opin Hematol* 2006; **13**: 301–307.
15. Budker VG, Subbotin VM, Budker T, Sebestyen MG, Zhang G, Wolff JA. Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. *J Gene Med* 2006; **8**: 874–888.
16. Sebestyen MG, Budker VG, Budker T, *et al.* Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med* 2006; **8**: 852–873.
17. Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 2005; **54**: 3–20.
18. Zhang G, Budker VG, Ludtke JJ, Wolff JA. Naked DNA gene transfer in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 2004; **245**: 251–264.
19. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; **99**: 119–145.
20. Grimm D, Kay MA. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2003; **3**: 281–304.
21. High K. AAV-mediated gene transfer for haemophilia. *Genet Med* 2002; **4**: 56S–61S.
22. Wang L, Herzog RW. AAV-mediated gene transfer for treatment of haemophilia. *Curr Gene Ther* 2005; **5**: 349–360.

23. Doenecke A, Frank E, Scherer MN, Schlitt HJ, Geissler EK. Prolongation of heart allograft survival after long-term expression of soluble MHC class I antigens and vIL-10 in the liver by AAV-plasmid-mediated gene transfer. *Langenbecks Arch Surg* 2008; **393**: 343–348.
24. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 2509–2514.
25. Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med* 1997; **3**: 808–811.
26. Walsh CE, Liu JM, Xiao X, Young NS, Nienhuis AW, Samulski RJ. Regulated high level expression of a human gamma-globin gene introduced into erythroid cells by an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 7257–7261.
27. Geissler EK, Wang J, Fechner JH, Jr., Burlingham WJ, Knecht SJ. Immunity to MHC class I antigen after direct DNA transfer into skeletal muscle. *J Immunol* 1994; **152**: 413–421.
28. Auricchio A, Hildinger M, O'Connor E, Gao GP, Wilson JM. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 71–76.
29. Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 1998; **72**: 2224–2232.
30. Girod A, Ried M, Wobus C, et al. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med* 1999; **5**: 1052–1056.
31. Clark KR, Liu X, McGrath JP, Johnson PR. Highly purified recombinant adeno-associated virus vectors are biologically active and free of detectable helper and wild-type viruses. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 1031–1039.
32. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; **57**: 225–229.
33. Graeb C, Justl M, Scherer MN, et al. Use of an adenoviral vector to express soluble donor-major histocompatibility complex molecules capable of suppressing the immune response in rat transplant recipients. *Hum Immunol* 2002; **63**: 844–852.
34. Geissler EK, Scherer MN, Graeb C. Soluble donor MHC class I gene transfer to thymus promotes allograft survival in a high-responder heart transplant model. *Transpl Int* 2000; **13**(Suppl 1): S452–S455.
35. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther* 1999; **6**: 1258–1266.
36. de Roos WK, Fallaux FJ, Marinelli AW, et al. Isolated-organ perfusion for local gene delivery: efficient adenovirus-mediated gene transfer into the liver. *Gene Ther* 1997; **4**: 55–62.
37. Morral N, O'Neal W, Rice K, et al. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12816–12821.
38. Snyder RO, Miao CH, Patijn GA, et al. Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 1997; **16**: 270–276.
39. Xiao W, Berta SC, Lu MM, Mosconi AD, Tazelaar J, Wilson JM. Adeno-associated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1998; **72**: 10222–10226.
40. Davidoff AM, Gray JT, Ng CY, et al. Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Mol Ther* 2005; **11**: 875–888.
41. Brunetti-Pierri N, Palmer DJ, Mane V, et al. Increased hepatic transduction with reduced systemic dissemination and proinflammatory cytokines following hydrodynamic injection of helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther* 2005; **12**: 99–106.
42. Takekubo M, Tsuchida M, Haga M, et al. Hydrodynamics-based delivery of plasmid DNA encoding CTLA4-Ig prolonged cardiac allograft survival in rats. *J Gene Med* 2007; **10**: 290–297.
43. Zhang G, Song YK, Liu D. Long-term expression of human alpha1-antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure. *Gene Ther* 2000; **7**: 1344–1349.
44. Ochiai H, Harashima H, Kamiya H. Intranuclear disposition of exogenous DNA in vivo: silencing, methylation and fragmentation. *FEBS Lett* 2006; **580**: 918–922.
45. Alino SF, Crespo A, Dasi F. Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Ther* 2003; **10**: 1672–1679.
46. Miao CH, Ye X, Thompson AR. High-level factor VIII gene expression in vivo achieved by nonviral liver-specific gene therapy vectors. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 1297–1305.
47. Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; **8**: 495–500.
48. Chen ZY, He CY, Meuse L, Kay MA. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther* 2004; **11**: 856–864.
49. Hackett PB, Ekker SC, Largaespada DA, McIvor RS. Sleeping beauty transposon-mediated gene therapy for prolonged expression. *Adv Genet* 2005; **54**: 189–232.
50. Masuda K, Yamamoto S, Endoh M, Kaneda Y. Transposon-independent increase of transcription by the Sleeping Beauty transposase. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **317**: 796–800.
51. Mikkelsen JG, Yant SR, Meuse L, Huang Z, Xu H, Kay MA. Helper-Independent Sleeping Beauty transposon-transposase vectors for efficient nonviral gene delivery and persistent gene expression in vivo. *Mol Ther* 2003; **8**: 654–665.
52. Piechaczek C, Fetzter C, Baiker A, Bode J, Lipps HJ. A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**: 426–428.
53. Jenke AC, Stehle IM, Herrmann F, et al. Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 11322–11327.
54. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 2001; **75**: 6969–6976.
55. Conlon TJ, Cossette T, Erger K, et al. Efficient hepatic delivery and expression from a recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped alpha1-antitrypsin vector. *Mol Ther* 2005; **12**: 867–875.
56. Nakai H, Montini E, Fuess S, et al. Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. *Mol Ther* 2003; **7**: 101–111.
57. Wang J, Xie J, Lu H, et al. Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 13104–13109.
58. Fabre JW, Grehan A, Whitehorne M, et al. Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava. *Gene Ther* 2008; **15**: 452–462.
59. Yoshino H, Hashizume K, Kobayashi E. Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume. *Gene Ther* 2006; **13**: 1696–1702.
60. Brunetti-Pierri N, Stapleton GE, Law M, et al. Efficient, long-term hepatic gene transfer using clinically relevant HDAd doses by balloon occlusion catheter delivery in nonhuman primates. *Mol Ther* 2009; **17**: 327–333.
61. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in haemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; **12**: 342–347.
62. Danos O. AAV gene vector manufacturing: what is feasible now and in the near future? Workshop. 24 June 2006; Méridien Beach Plaza Hotel, Monte Carlo, 2006.
63. Hebel H, Attra H, Khan A, Draghia-Akli R. Successful parallel development and integration of a plasmid-based biologic, container/closure system and electrokinetic delivery device. *Vaccine* 2006; **24**: 4607–4614.
64. Watson R. *The Vector Directory: An Analysis of International GMP Gene Therapy Vector Capacity and Capability*. London: Department of Health; 2007.
65. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther* 2004; **10**: 386–398.
66. Wells DJ. Opening the floodgates: clinically applicable hydrodynamic delivery of plasmid DNA to skeletal muscle. *Mol Ther* 2004; **10**: 207–208.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: PD Dr. rer. nat. med. habil. Dipl. Chem. Axel Doenecke
Geburtsdatum: 08. 04. 1968
Geburtsort: Heidelberg
Nationalität: deutsch

Berufstätigkeit

seit 04/2011	Oberarzt, Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Uni-Klinikum Regensburg (Dir. Prof. Dr. H.-J. Schlitt)
03/2000 – 04/2011	Assistenzarzt; Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Uni-Klinikum Regensburg (Dir. Prof. Dr. H.-J. Schlitt, Dir. Prof. Dr. K-W. Jauch (bis 03/2003))
04/1999 – 02/2000	Arzt im Praktikum; Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Uni-Klinikum Regensburg (Dir. Prof. Dr. K-W. Jauch)
09/1998 – 03/1999	Arzt im Praktikum, herzchirurgische Klinik, Klinikum Großhadern, Universität München (Dir. Prof. Dr. B. Reichart)
06/1994 – 04/1997	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Genzentrum (Prof. Winnacker, Prof. Hallek)

Habilitation

05/2011	Universität Regensburg (Prof. Dr. H.-J. Schlitt): „Entwicklung und Anwendung von adeno-assoziierten virus-basierten Vektoren in der somatischen Gentherapie“
---------	---

Dissertation

06/1994 -04/1997	Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München (Dr. Michael Hallek, Prof. Dr. E.- L. Winnacker): „Generierung lymphomspezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Klonierung und Expression von B-Zell-spezifischen Tumorantigenen“
------------------	--

Hochschulstudium

11/1991 – 05/1998	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
11/1987 – 10/1992	Chemiestudium, Universität Karlsruhe, Ludwig-Maximilians-Universität München Diplomarbeit (Institut für Biochemie, Prof. Dr. E.-L. Winnacker): „ <i>In vitro</i> Stimulation der DNA Polymerase α durch den Nuklearfaktor I“

Auslandsstudien

06/1998	1. Teil des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 1) in Frankfurt
03/1998	2. Teil des amerikanischen Staatsexamens (USMLE Step 2) in Denver, Colorado, USA
12/1997 – 03/1998	Dept. of Anesthesiology, University Hospital, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA
08/1997 – 11/1997	Dept. of Nephrology, Hershey Medical Center, Pennsylvania State University, Hershey, Pennsylvania, USA

Weiterbildung/Ergänzungsstudium

07/2010 – 04/2011	Intensivstudium Gesundheitsökonomie; European Business School (EBS)
-------------------	---

Schulische Ausbildung

09/1978 – 06/1987	Staatliches Männlich Gymnasium Homburg/Saar Abitur 06/1987
09/1974 – 07/1978	Grundschule in Homburg/Saar

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Geissler möchte ich für die Betreuung und hervorragende Unterstützung nicht nur während der Anfertigung dieser Arbeit danken. Mit seiner Hilfe hat er wesentlich zum Gelingen dieser und weiterer Arbeiten beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Schlitt danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Chirurgie und unter Zuhilfenahme der dort vorhandenen Ressourcen durchführen zu können.

Prof. Dr. Marcus Scherer, Dr. Alexander Krömer sowie Erika Ostermeier möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente danken. Auch ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht durchführbar gewesen.

Erklärungen

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel "AAV plasmid DNA simplifies liver-directed *in vivo* gene therapy: comparison of expression levels after plasmid DNA-, adeno-associated virus- and adenovirus-mediated liver transfection" wurde durch Anregung von Prof. Dr. Edward K. Geissler und unter Überwachung der Ausarbeitung durch Prof. Dr. Edward K. Geissler durchgeführt.

Nach § 6 Absatz 5 der Promotionsordnung der Universität Regensburg vom 12.06.2008 erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.